

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2002年2月14日 (14.02.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/12520 A1(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/84, 5/14, A01H 1/00, 5/00

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(21) 国際出願番号:

PCT/JP00/05213

(22) 国際出願日: 2000年8月3日 (03.08.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 日本たばこ産業株式会社 (JAPAN TOBACCO INC.) [JP/JP]; 〒105-8422 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 横江井祐弘 (HIEI, Yukoh) [JP/JP]. 笠岡啓介 (KASAOKA, Keisuke) [JP/JP]. 石田祐二 (ISHIDA, Yuji) [JP/JP]; 〒438-0802 静岡県磐田郡豊田町東原700番地 日本たばこ産業株式会社 遺伝育種研究所内 Shizuoka (JP).

(74) 代理人: 谷川英次郎 (TANIGAWA, Hidejiro); 〒102-0072 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル6階 谷川国際特許事務所内 Tokyo (JP).

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF IMPROVING GENE TRANSFER EFFICIENCY INTO PLANT CELLS

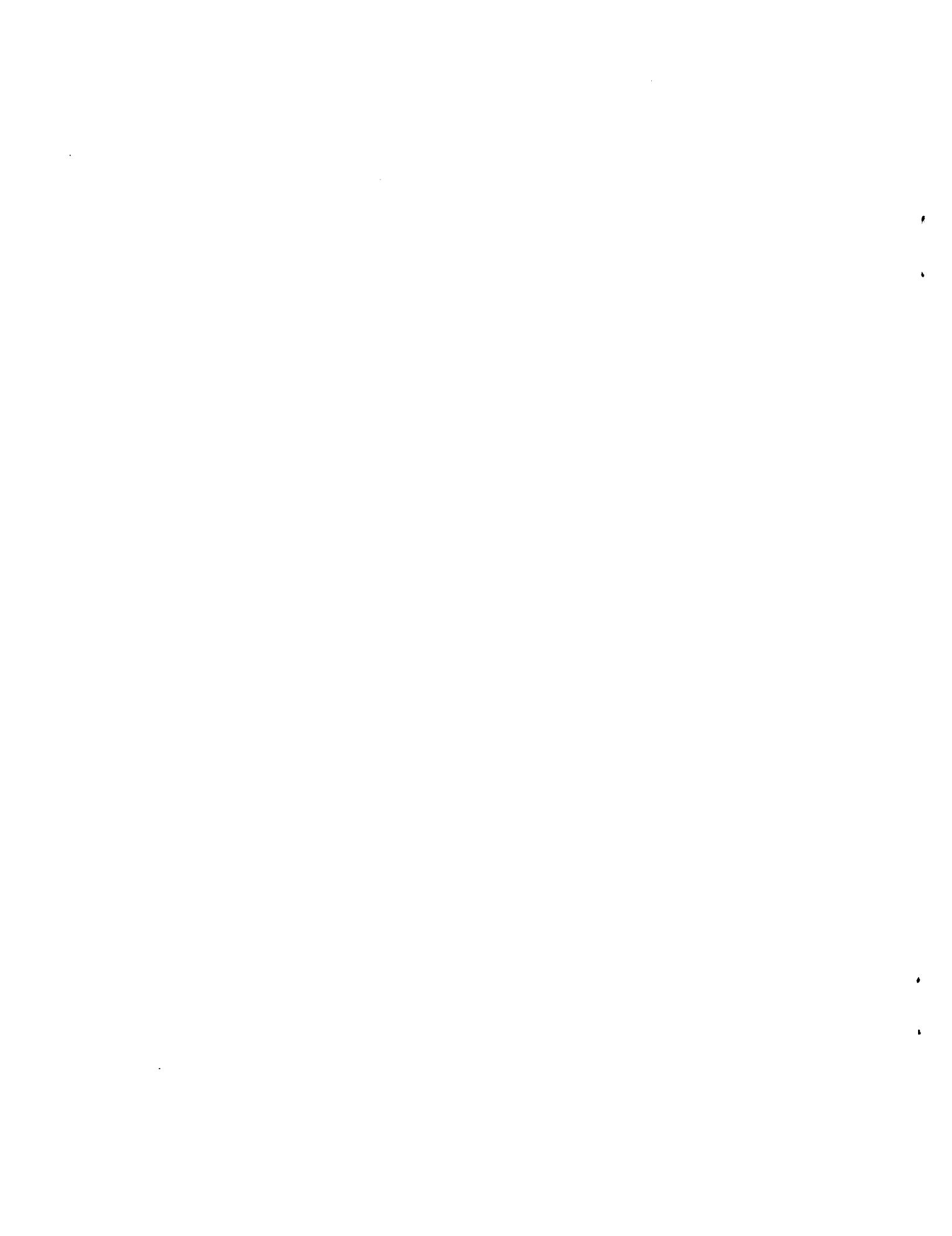
(54) 発明の名称: 植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法

(57) Abstract: A method of improving the efficiency of transferring a gene into plant cells whereby gene transfer can be conveniently carried out without damaging the tissues at a higher efficiency than by the conventional *Agrobacterium* gene transfer method. In this method, plant cells or plant tissues are centrifuged to thereby improve the transfer of the gene into the plant cells mediated by a bacterium belonging to the genus *Agrobacterium*.

(57) 要約:

従来のアグロバクテリウム法による遺伝子導入方法よりも高い効率で組織を付傷することなく簡便に遺伝子導入を行うことができる、植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法が開示されている。本発明の方法では、植物細胞又は植物組織を遠心処理することを伴うことにより、アグロバクテリウム属細菌を介して行われる植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる。

WO 02/12520 A1



明細書

植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法

技術分野

本発明は、植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法に関する。

5

背景技術

アグロバクテリウムによる形質転換法は、一般的に、効率が高い、導入される遺伝子のコピー数が少ない、T-DNAという特定の領域を断片化させることなく導入できる、短期間の培養により形質転換体を得ることができるため培養変異が少ないなど、多くの優れた特徴を持っている。このため、さまざまな植物種で最も有用な形質転換の手段として広く用いられている。

このように、アグロバクテリウム法は非常に優れた植物の形質転換方法であるが、形質転換の成否ならびに効率は、植物種、遺伝子型ならびに用いる植物組織に依存して大きく異なるのが実状である (Potrykus et al. 1998 (参考文献(33)))。すなわち、形質転換に成功していない植物種があるほか、ごく一部の品種のみ形質転換が可能な植物種も多い。また、利用可能な組織が限定されており大量の材料を取り扱うことができない植物種もある。遺伝子組換えにより実用的な品種を作出するには、多数の形質転換植物を作出した上で、目的とする形質を持った系統を選抜する必要がある。しかしながら、この目的に即し多数の形質転換体を容易に得ることができる作物の種類は、現状では一部に限定されている。したがって、このような問題点を解決することができる改良手法の開発が強く望まれている。

アグロバクテリウムを介する形質転換方法自体は、植物種により供試材料や培養に用いる培地の組成などを異にするものの、材料となる組織にアグロバクテリウムの懸濁液を接触させ、共存培養の後に形質転換細胞の選抜を行い、形質転換植物を作出するという操作ではほぼ共通している。材料となる植物組織には対しては、通常、必要に応じ滅菌処理を行うがそれ以外に特別な処理を施すことなくアグロバクテリウムの感染が行われる (Rogers et al. 1988 (参考文献(34)), Visser 1991 (参考文献(38)), McCormick 1991 (参考文献(29)), Lindsey et al. 19

10

15

20

25

91(参考文献(28)))。従って、形質転換系の改良は、アグロバクテリウムの菌系、ベクター構成、培地組成、選抜マーカー遺伝子やプロモーターの種類、供試組織の種類などを中心に研究が行われてきた。

これに対し、アグロバクテリウムを接種する前の植物組織を、遺伝子導入が生じやすい生理的状態に変換するという考え方に基づく研究は、ほとんど行われていない。何らかの簡便な処理により、そのような生理的状態に変換することができればたいへん利用価値が高く、遺伝子導入効率の向上に加え、従来困難であった植物種や遺伝子型の形質転換を可能にする顕著な効果も期待される。これまでの植物組織への前処理に関する研究例としては、パーティクルガン(Bidney et al., 1992(参考文献(5)))および超音波(Trick et al., 1997(参考文献(37)))処理が上げられる。どちらも物理的に組織を付傷することでバクテリアの植物組織内への侵入を促し、感染対象となる植物細胞を増加させることを目的としている。しかしながら、これは従来より広く行われているリーフディスク法(Horsch et al., 1985(参考文献(17)))を発展させたものに過ぎず、新規な考え方に基づく処理法ではない。なお、効果の程度や汎用性は明らかでなく、一般的な手法として用いられていないのが現状である。

発明の開示

従って、本発明の目的は、従来のアグロバクテリウム法による遺伝子導入方法よりも高い効率で組織を付傷することなく簡便に遺伝子導入を行うことができる、植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法を提供することである。

本願発明者らは、鋭意研究の結果、アグロバクテリウム属細菌を用いた遺伝子導入方法において、遺伝子導入に供する植物細胞又は植物組織を遠心処理することにより、遺伝子導入効率を有意に向上させることができることを見出し本発明を完成した。

すなわち、本発明は、植物細胞又は植物組織を遠心処理することを伴う、アグロバクテリウム属細菌を介して行われる植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法を提供する。

本発明により、従来のアグロバクテリウム法による遺伝子導入方法よりも高い

効率で、組織を付傷することなく簡便に遺伝子導入を行うことができる、植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法が提供された。本発明の方法は、単子葉植物に対しても双子葉植物に対しても適用可能である。

図面の簡単な説明

5 図1は、本発明の方法に好ましく用いることができるスーパーバイナリーベクターの例であるpTOK233の構築方法を示す図である。

図2は、本発明の方法に好ましく用いることができるスーパーバイナリーベクターの例であるpSB133の遺伝子地図を示す図である。

10 図3は、アグロバクテリウム属細菌の主要な2種類のベクターシステムである中間ベクターシステムとバイナリーベクターシステムの構築過程を示す模式図である。

図4は、アグロバクテリウム ツメファシエンスの強病原性菌株 A281 に由来する2種類のバイナリーベクターシステムを示す模式図である。

なお、上記各図中、下記の符号は下記の意味を表す。

15 virB Agrobacterium tumefaciens A281に含まれるT i プラスミドpTiBo542の
ヴィルレンス領域中のvirB遺伝子

virC Agrobacterium tumefaciens A281に含まれるT i プラスミドpTiBo542の
ヴィルレンス領域中のvirC遺伝子

19 virG Agrobacterium tumefaciens A281に含まれるT i プラスミドpTiBo542の
ヴィルレンス領域中のvirG遺伝子

BL アグロバクテリウム属細菌のT-DNAの左ボーダー配列

BR アグロバクテリウム属細菌のT-DNAの右ボーダー配列

TC テトラサイクリン抵抗性遺伝子

SP スペクチノマイシン抵抗性遺伝子

25 IG イントロンGUS遺伝子

HPT ハイグロマイシン抵抗性遺伝子

K 制限酵素KpnI部位

H 制限酵素 HindIII 部位

Amp^r アンピシリン耐性遺伝子

BAR bar 遺伝子

Pnos ノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター

Tnos ノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター

5 P35S CaMV 35S プロモーター

COS, cos ラムダファージの COS 部位

ORI, ori ColE1 の複製開始点

NPT, NPTII カナマイシン抵抗性遺伝子

Vir アグロバクテリウム属細菌のTiプラスミドの全vir領域

10 S Vir 強病原性アグロバクテリウム属細菌のTiプラスミドpTiBo542の全vir領域

s vir* TiプラスミドpTiBo542のvir領域の一部を含む断片

発明を実施するための最良の形態

本発明の方法では、アグロバクテリウム属細菌を介した遺伝子導入方法において、遺伝子を導入する植物細胞又は植物組織を遠心処理することを伴う。植物細胞又は植物組織は、遠心処理した後、通常の重力下でアグロバクテリウム属細菌と接触させてもよいし、遠心処理しながらアグロバクテリウム属細菌と接触させてもよい。好ましくは、植物細胞又は植物組織を遠心処理した後、通常の重力下でアグロバクテリウム属細菌と接触させる方法である。

遠心処理条件は、用いる植物の種類等に応じて適宜選択されるが、通常、100G～25万G、好ましくは500G～20万G、さらに好ましくは1000G～15万G程度の遠心加速度範囲で行われる。また、遠心処理の時間は、遠心加速度及び用いる植物の種類等に応じて適宜選択されるが、通常1秒間以上行うことが好ましい。なお、遠心時間の上限は特にないが、通常、10分間程度で目的を達成することができる。なお、遠心処理時間は、遠心加速度が大きい場合には極く短い時間、例えば1秒以下でも遺伝子導入効率を有意に向上させることができる。一方、遠心加速度が小さい場合には、遠心処理を長く行うことにより遺伝子導入効率を有意に向上させることができる。特に好ましい遠心処理条件は、5

00G～20万G、特には1000G～15000Gで1秒間～2時間程度の場合が多いが、その植物細胞又は植物組織にとっての適切な遠心処理条件は、ルーチンな実験により容易に設定することができる。

本発明の方法は、アグロバクテリウム属細菌と接触させる植物細胞又は植物組織として遠心処理したもの用いる、又は遠心処理を行いながらアグロバクテリウム属細菌と接触させることを特徴とするものであり、アグロバクテリウム属細菌を用いた遺伝子導入あるいは形質転換方法自体としては、周知の方法をそのまま適用することができる。

アグロバクテリウム属細菌を用いた植物への遺伝子導入あるいは形質転換方法自体は、この分野において周知であり、広く用いられている。

土壤細菌アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) が多くの双子葉植物に根頭癌腫病 (crown gall disease) を引き起こすことは古くから知られており、1970年代には、Ti プラスミドが病原性に関与すること、さらに Ti プラスミドの一部である T-DNA が植物ゲノムに組み込まれることが発見された。その後この T-DNA には癌腫の誘発に必要なホルモン (サイトカイニンとオーキシン) の合成に関与する遺伝子が存在し、細菌遺伝子でありながら植物中で発現することが明らかにされた。T-DNA の切り出しと植物への伝達には Ti プラスミド上のヴィルレンス領域 (vir 領域) に存在する遺伝子群が必要であり、また T-DNA が切り出されるためには T-DNA の両端に存在するボーダー配列が必要である。他のアグロバクテリウム属細菌である *Agrobacterium rhizogenes* も Ri プラスミドによる同様なシステムを有している (図3及び図4)。

アグロバクテリウムの感染によって T-DNA が植物ゲノムに組み込まれるので、T-DNA 上に所望の遺伝子を挿入するとこの遺伝子も植物ゲノムに組み込まれることが期待された。しかしながら、Ti プラスミドは 190kb 以上と巨大であるため、標準的な遺伝子工学手法ではプラスミド上の T-DNA 上に遺伝子を挿入することは困難であった。そのため、T-DNA 上に外来遺伝子を挿入するための方法が開発された。

まず、腫瘍性の Ti プラスミドの T-DNA からホルモン合成遺伝子が除去された

ディスアーム型の菌系 (disarmed strains) である LBA4404 (Hoekema et al., 1983(参考文献(12)))、C58C1 (pGV3850) (Zambryski et al., 1983(参考文献(40)))、GV3Ti11SE (Fraley et al., 1985(参考文献(9))) などが作製された (図3)。これらを用いることにより、所望の遺伝子をアグロバクテリウムの Ti プラスミドの T-DNA 中に、あるいは所望の遺伝子を有する T-DNA をアグロバクテリウムに導入する 2 種類の方法が開発された。このうちの一つは、遺伝子操作が容易で所望の遺伝子の挿入が可能であり、大腸菌で複製ができる中間ベクターを、アグロバクテリウムのディスアーム型 Ti プラスミドの T-DNA 領域中に、三系交雑法 (triparental mating) (Ditta et al., 1980(参考文献(8))) を介して相同組換えにより導入する方法であり、中間ベクター法と呼ばれる (Fraley et al., 1985(参考文献(9)); Fraley et al., 1983(参考文献(10)); Zambryski et al., 1983(参考文献(40))、特開昭 59-140885 号 (EP116718))。もう一つは、バイナリーベクター (binary vector) 法とよばれるもので (図3)、T-DNA の植物への組み込みに vir 領域が必要であるが、機能するために同じプラスミド上に存在する必要はないという結果 (Hoekema et al., 1983) に基づいている。この vir 領域には virA、virB、virC、virD、virE 及び virG が存在し、(植物バイオテクノロジー事典 (エンタプライズ株式会社発行 (1989)))、vir 領域とはこの virA、virB、virC、virD、virE 及び virG の全てを含むものをいう。したがって、バイナリーベクターは、T-DNA をアグロバクテリウムと大腸菌の両方で複製可能な小さなプラスミドに組み込んだものであり、これをディスアーム型 Ti プラスミドを有するアグロバクテリウムに導入して用いる。アグロバクテリウムへのバイナリーベクターの導入には、エレクトロポレーション法や三系交雑法などの方法により行うことができる。バイナリーベクターには、pBIN19 (Bevan, 1984(参考文献(4)))、pBI121 (Jefferson, 1987(参考文献(19)))、pGA482 (An et al., 1988(参考文献(2)))、特開昭 60-70080 号 (EP120516))などがあり、これらをもとに数多くの新たなバイナリーベクターが構築され、形質転換に用いられている。また、Ri プラスミドのシステムにおいても、同様なベクターが構築され形質転換に用いられている。

アグロバクテリウム A281 (Watson et al., 1975 (参考文献(39))) は、強病原性 (super-virulent) の菌系であり、その宿主範囲は広く、形質転換効率も他の菌系より高い (Hood et al., 1987 (参考文献(13)) ; Komari, 1989 (参考文献(21)))。この特性は、A281 が有する Ti プラスミドの pTiBo542 によるものである (Hood et al., 1984 (参考文献(16)) ; Jin et al., 1987 (参考文献(20)) ; Komari et al., 1986 (参考文献(24)))。

pTiBo542 を用いて、これまでに 2 つの新しいシステムが開発されている。一つは pTiBo542 のディスアーム型の Ti プラスミドを有する菌系 EHA101 (Hood et al., 1986) および EHA105 (Hood et al., 1993) を用いたものであり、これらを上述のバイナリーベクターシステムに適用することにより、形質転換能力の高いシステムとして種々の植物の形質転換に利用されている。もう一つは、スーパーバイナリーベクター ('super-binary' vector) (Hiei et al., 1994 (参考文献(11)) ; Ishida et al., 1996 (参考文献(18)) ; Komari et al., 1999 (参考文献(26))、W094/00977 号、W095/06722 号) システムである (図 4)。このシステムは、vir 領域 (virA, virB, virC, virD, virE 及び virG (以下、これらをそれぞれ「vir 断片領域」ということもある。)) を持つディスアーム型の Ti プラスミドおよび T-DNA を有するプラスミドからなることから、バイナリーベクターシステムの一種である。しかしながら、T-DNA を有する側のプラスミド、即ちバイナリーベクターに vir 断片領域のうち、少なくとも一つの vir 断片領域を実質的に取除いた vir 領域の断片 (このうち好ましくは少なくとも virB 又は virG を含む断片、さらに好ましくは virB 及び virG を含む断片) を組み込んだ (Komari, 1990a (参考文献(22))) スーパーバイナリーベクターを用いる点で異なる。なお、スーパーバイナリーベクターを有するアグロバクテリウムに、所望の遺伝子を組み込んだ T-DNA 領域を導入するには、三系交雑法を介した相同組換えが容易な手法として利用できる (Komari et al., 1996 (参考文献(25)))。このスーパーバイナリーベクターシステムは、上述の種々のベクターシステムと比べて、多くの植物種で非常に高い形質転換効率をもたらすことが明らかとなっている (Hiei et al., 1994 (参考文献(11)) ; Ishida et al., 1996 (参考文献(18)) ; Komari, 1990b (参考文

献(23)) ; Li et al., 1996(参考文献(27)) ; Saito et al., 1992(参考文献(35)))。

本発明の方法においては、宿主となるアグロバクテリウム属細菌としては、特に限定されないが、*Agrobacterium tumefaciens* (例えば上述の *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (Hoekema et al., 1983(参考文献(12))) および EHA101 (Hood et al., 1986(参考文献(15))) を好ましく用いることができる。

本発明の方法によれば、アグロバクテリウム属細菌における病原性 (vir) 領域の遺伝子群の発現に基づく遺伝子導入系であれば、特に限定されることなく有意な効果を得ることができる。したがって、上述の中間ベクター、バイナリーベクター、強病原性のバイナリーベクター、スーパーバイナリーベクターなどいずれのベクターシステムに対しても用いることができ、本発明による効果を得ることができる。これらのベクター類を改変した異なるベクターシステムを用いた場合においても同様である (例えば、アグロバクテリウム属細菌の vir 領域の一部または全部を切り出し付加的にプラスミド中に組み込む、vir 領域の一部または全部を切り出し新たなプラスミドの一部としてアグロバクテリウムに導入するなど)。また、当然ではあるが本発明の方法によれば、野生型のアグロバクテリウム属細菌においても、植物へ野生型の T-DNA 領域の導入効率を高め、事実上感染効率を向上することができる。

植物に導入しようとする所望の遺伝子は、上記プラスミドの T-DNA 領域中の制限酵素部位に常法により組み込むことができ、当該プラスミドに同時に若しくは別途組込んだカナマイシン、パロモマイシン等の薬剤に対する耐性を有する遺伝子等の適当な選択マーカーに基づいて選択することができる。大型で多数の制限部位を持つものは、通常のサブクローニングの手法では所望の DNA を T-DNA 領域内に導入することが必ずしも容易でないことがある。このような場合には、三系交雑法により、アグロバクテリウム属細菌の細胞内での相同組換えを利用するこことで目的の DNA を導入することができる。

また、プラスミドを *Agrobacterium tumefaciens* 等のアグロバクテリウム属細菌に導入する操作は従来法により行うことができ、例としては、上記した三系交

雑法やエレクトロポレーション法、エレクトロインジェクション法、PEGなどの化学的な処理による方法などが含まれる。

植物に導入しようとする遺伝子は、従来の技術と同様に基本的にはT-DNAの左右境界配列の間に配置されるものである。しかし、プラスミドが環状であるため、
5 境界配列の数は1つでもよく、複数の遺伝子を異なる部位に配置しようとする場合には、境界配列が3個以上あってもよい。また、アグロバクテリウム属細菌中で、TiまたはRiプラスミド上に配置されてもよく、または他のプラスミド上に配置されてもよい。さらには、複数の種類のプラスミド上に配置されてもよい。

アグロバクテリウム属細菌を介して遺伝子導入を行う方法は、植物細胞又は植物組織をアグロバクテリウム属細菌と単に接觸させることにより行うことができる。例えば、 $10^6 \sim 10^{11}$ 細胞/m^l程度の細胞濃度のアグロバクテリウム属細菌懸濁液を調製し、この懸濁液中に植物細胞又は植物組織を3～10分間程度浸漬後、固体培地上で数日間共存培養することにより行うことができる。

遺伝子導入に供される細胞又は組織は、何ら限定されるものではなく、葉、根、
15 茎、実、その他いずれの部位であってもよいし、カルスのような脱分化したものでも脱分化していない胚等であってもよい。また、植物の種類も何ら限定されないが、被子植物が好ましく、被子植物ならば双子葉植物でも单子葉植物でもよい。

下記実施例において具体的に示されるように、本発明の方法によれば、従来のアグロバクテリウム法に比較して、遺伝子導入の効率が有意に向上する。

20 実施例

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

実施例1

(1) アグロバクテリウムの菌系およびプラスミド

アグロバクテリウムおよびそのベクターには、LBA4404 (pBI121) (pBI121は米国クローンテック社より市販、(Jefferson RA 1987 (参考文献(19)))、LBA4404 (pLG121Hm) (Hiei, Y. et al., 1994 (参考文献(11)))、LBA4404 (pTOK233) (Hiei et al., 1994 (参考文献(11))) および LBA4404 (pSB133) (図2) を用いた。

なお、pSB133 の構築は、以下のように行った。pGA482(An G et al., 1985(参考文献(3)))を制限酵素 Sal I で消化して得た 6.2 kb のDNA断片を、pSB11(Komari et al., 1996(参考文献(25))を Sal I で消化して得られる 5.1 kbp のDNA断片と結合してプラスミドを作製した。次いで、このプラスミドを制限酵素 Eco RI、BgIII で消化して 8.6 kb のDNA断片を得た。このDNA断片を平滑化処理し、BgIII リンカー(TaKaRa 社製)を挿入してプラスミド pSB27 を得た。この pSB27 を制限酵素 HindIII で消化し、pIG221(Ohta S et al., 1990(参考文献(32))を Hind III で消化することで得られる 3.1 kb の 35S プロモーター及びイントロン介在 GUS 遺伝子を含む断片を挿入して pSB33 を得た。pSB33 を大腸菌 LE392 株に導入した後、Triparental mating 法(Ditta G et al., 1980(参考文献(8)))により、pSB1(Komari et al., 1996(参考文献(25)))を有するアグロバクテリウム LBA4404 株に導入した。pSB133 はアグロバクテリウム内で pSB1 と pSB33 の間の相同組換えにより得られた。pBI121 の T-DNA 領域には、ノパリン合成酵素遺伝子(nos)のプロモーターにより制御されるカナマイシン耐性遺伝子(nptII)、カリフラワーモザイクウィルス(CaMV)の 35S プロモーターにより制御される GUS 遺伝子を有する。pIG121Hm 及び pTOK233 の T-DNA 領域には、nos プロモーターにより制御される nptII 遺伝子、35S プロモーターにより制御される hpt 遺伝子、35S プロモーターにヒマのカタラーゼ遺伝子のイントロンが介在する GUS 遺伝子を有する。また、pSB133 の T-DNA 領域には、nos プロモーターにより制御される nptII 遺伝子、CaMV の 35S プロモーターに制御されヒマのカタラーゼ遺伝子のイントロンが介在する GUS 遺伝子を有する(図2)。なお、pSB133 及び pTOK233 は形質転換能力が高いスーパーバイナリーベクター(Komari, T. et al., 1999(参考文献(26)))である。

(2) 供試品種および組織

供試品種として、日本稲品種のコシヒカリおよび月の光を用いた。開花後 8~14 日目の未熟種子の穎を除去し、70%エタノールで数秒、ツイーン 20 を含む 1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で 15 分間滅菌処理を行った。滅菌水で数回洗浄後、長さ 1.5~2mm の未熟胚を摘出し供試組織とした。

(3) 遠心処理

イネ未熟胚を滅菌水入りのチューブの中に入れ、微量高速遠心機、大型高速遠心機もしくは超高速遠心機を用いて、760G～150,000Gの遠心処理を行った。遠心処理終了後、未熟胚にアグロバクテリウムを接種した。

5 (4) 接種および共存培養

未熟胚への接種および共存培養の方法は、Hiei et al. (1994) (参考文献(11))によった。すなわち、遠心処理後、チューブ内部の滅菌水を除き、アグロバクテリウムの懸濁液を加え、5～30秒間ボルテックスミキサーにより攪拌した。

10 バクテリア懸濁液の調製は、AB培地 (Chilton, M-D et al., 1974 (参考文献(6))) 上で3～10日間培養したアグロバクテリウムのコロニーを白金耳でかきとり、修正AA培地 (AA主要無機塩類、AAアミノ酸及びAAビタミン類 (Toriyama K. et al., 1985 (参考文献(36)))、MS微量塩類 (Murashige, T et al., 1962 (参考文献(30)))、1.0 g/l カザミノ酸、100 μM アセトシリンゴン、0.2 M ショ糖、0.2 M グルコース) に懸濁することにより行った。約5分間室温で静置した後、共存培養用の培地に置床した。共存培養用の培地としては、2N6-AS培地 (Hiei et al. 1994 (参考文献(11))) の無機塩類をR2培地 (Ohira et al. 1973 (参考文献(31))) の組成に変更して用いた。ただし、主要無機塩類 (KNO_3 , KH_2PO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) については1/2の濃度で培地に添加した。なお、接種菌密度は 1×10^8 ~ 1×10^9 cfu/ml に調整した。共存培養は3～13日間行い、一部の未熟胚についてX-Glcを処理することによるGUS発現を調査した (Hiei et al. 1994) (参考文献(11))。すなわち、共存培養処理直後、組織を0.1% Triton X-100を含む0.1 M リン酸緩衝液 (pH6.8) に浸漬し、37°Cで1時間静置した。リン酸緩衝液でアグロバクテリウムを除去した後、1.0 mM 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-グルクロン酸 (X-glcuc) および20% メタノールを含むリン酸緩衝液を添加した。37°Cで24時間処理した後、青色の呈色を示す組織を顕微鏡下で観察した。

25 (5) 形質転換細胞の選抜

共存培養後、未熟胚およびカルスを 250mg/l カルベニシリンおよび 250mg/l セフォタキシムを含み、200mg/l パロモマイシンまたは 10~30mg/l ハイグロマイシンを含む 1 次選抜培地に移植し、30°C 明条件下で 1~2 週間培養した。1 次選抜培地には、Hiei et al. (1994) (参考文献(11)) による 2N6K 培地に 30g/l の D-ソルビトールを添加した培地を用いた (K 培地)。また、Hiei et al. (1994) (参考文献(11)) による 2N6 培地 (N6 の無機塩およびビタミン類 (Chu C. C. 1978 (参考文献(7))))、1 g/l カザミノ酸、2 mg/l 2, 4-D の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を 232 mg/l とし AA 培地 (Toriyama et al., 1985 (参考文献(36))) のアミノ酸類を添加した培地についても試験に供した (N 培地)。

1 次選抜培地上に形成されたカルスを、250mg/l セフォタキシムおよび 250mg/l カルベニシリンを含み、200mg/l パロモマイシンもしくは 80mg/l ハイグロマイシンを含む 2 次選抜培地上に移植し、30°C 明条件下で 1~2 週間の培養を行った。2 次選抜培地には、Hiei et al. (1994) (参考文献(11)) による N6-7 培地の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を 232 mg/l とし AA 培地 (Toriyama et al., 1985 (参考文献(36))) のアミノ酸類を添加した培地を使用した。なお、パロモマイシンを含有する上記の 1 次および 2 次選抜培地には、培地固化剤に 8g/l アガロースを使用した。耐性カルスの出現率は、2 次選抜後に調査した。

(6) 形質転換体の再分化

未熟胚の胚盤部位から得られた選抜薬剤耐性のカルスを、250mg/l カルベニシリンおよび 250mg/l セフォタキシムを含み、100mg/l パロモマイシンまたは 50mg/l ハイグロマイシンを含む再分化培地 N6S3 培地 (Hiei et al. 1994 (参考文献(11))) 上に置床した。

(7) 再分化個体における GUS 発現の調査

25°C 明条件下で 4~5 週間の再分化培養を行なって得られた各薬剤耐性の再分化植物の葉片を、上記のように X-Gluc を処理することにより、GUS 発現を調査した (Hiei et al. 1994 (参考文献(11)))。再分化個体は 500 倍の Hyponex 水溶液中に移植し、25°C 明条件下で約 2 週間育苗した後、温室内のポットへ移植した。

(8) 結果

(i) 遠心処理効果の検討

微量高速遠心機、大型高速遠心機および超高速遠心機を用いてイネの未熟胚への遠心処理効果を調べた結果、10KG から 100KG の範囲の処理で遺伝子の導入効率が高まつた(表 1, 2, 3, 6)。処理時間については 10 分間の処理で明らかな効果が認められた(表 4, 5)。また、コシヒカリと月の光の品種間での GUS の一過性発現頻度に違いは認められなかった。なお、遠心処理は遺伝子導入効率の向上だけではなくカルス誘導を促進する効果が認められたことから、ほかの植物種を含めて、培養におけるカルスの誘導および増殖に有用であることが示唆された。

表 6 の結果から超高速遠心機を用いた 250KG の 60 分処理では、月の光未熟胚からのカルス誘導が全く認められなかった。しかし、110KG の 60 分処理ではカルス誘導が確認され、GUS 発現も高率で認められた。同様にコシヒカリについても超高速遠心機を用いた 250 KG·60 分処理では、未熟胚からのカルス誘導が認められなかつた。以上の結果から、イネ未熟胚における遠心処理の効果の範囲は 5KG ~200KG と考えられ、処理方法の簡便性を考慮すると微量高速遠心機および大型高速遠心機を使用する場合には、20KG, 40KG 処理が適当と考えられる。さらに表 9, 10, 11 の結果から、形質転換能力が高いとされるスーパーバイナリーベクターを有する LBA4404 (pSB133) のみならず、通常のバイナリーベクターである LBA4404 (pIG121Hm) でも、20KG·60 分の遠心処理により未熟胚を用いた形質転換が可能であることが明らかとなつた。

(ii) 遠心処理と共存培養期間の検討

表-7, 8 の結果から共存培養期間が 3 日より 6, 13 日がトランジェントアッセイで高い GUS 発現効率を示した。共存培養期間が 9 日についても別の実験で高い GUS 発現が認められた。現在、共存培養期間が異なる各種未熟胚を一次選抜培地上 (10ppm ハイグロマイシン, 200ppm パロモマイシン) で培養しているが、9, 13 日共存の区では、3, 6 日の共存区と比較して薬剤耐性カルスの出現率が低い傾向にある。

(iii) 遠心処理による形質転換効率の調査

現在、上記により作出した GUS 陽性の形質転換体(表 4, 5)をそれぞれ順化し、栽培を継続している。一部分の系統については、採種を終了し稔性調査を行った。その結果、遠心処理した形質転換体は無処理の形質転換体(コシヒカリ、月の光)と比較し、形態および稔性に差は認められなかった。

5 Hiei et al. (1994 (参考文献(11))) は、イネのカルスを材料として比較的高い効率で形質転換が行うことができることを報告している。また、Aldemita R R et al. 1996(参考文献(1))は、イネの未熟胚を用いた形質転換例を報告している。これらの形質転換手法をより効率よく安定して実施するために、上述した遠心処理法は非常に有効である。特に、未熟胚は栽培環境に左右されやすく形質転換に好適な未熟胚材料を常時得ることは容易ではないが、遠心処理を施すことにより安定した高い形質転換効率を維持することが可能である。Hiei et al. (199
10 4 (参考文献(11))) は、形質転換能力の高いベクターであるスーパーバイナリーベクターがイネの形質転換効率を向上させることを示した。また、Aldemita e t al., 1996(参考文献(1))によれば、スーパーバイナリーベクターの LBA4404(p
15 T0K233)を用いた試験においてのみ、形質転換体を得ている。本研究における遠心処理法は、通常のバイナリーベクターを用いた場合においても、スーパーバイナリーベクターに匹敵するか、それ以上の遺伝子導入効率を得ることができる。また、スーパーバイナリーベクターと遠心処理法を併用することにより、より一層効率を向上させることが可能である。さらに、遠心処理法を用いることにより、これまで全く形質転換体を得ることができなかつた品種においても形質転換体を得ることができるものと推察される。
20

表1 各種遠心処理と共存培養後の GUS 発現結果 (供試菌系 : LBA4404/pSB133)

| 各品種 | 接種菌濃度(cfu/ml) | 無処理 | 遠心加速度 | | |
|-------|-------------------|---------|----------|----------|-----------|
| | | | 760 G | 8,500 G | 19,100 G |
| コシヒカリ | 1×10^8 | 3/10(+) | 6/10(+) | 7/10(++) | 7/10(+++) |
| | 1×10^9 | 2/10(+) | 0/10(-) | 4/10(++) | 7/10(+++) |
| 月の光 | 1×10^8 | 4/10(+) | 3/10(+) | 9/10(++) | 7/10(+++) |
| | 1×10^9 | 1/10(+) | 6/10(++) | 2/10(+) | 7/10(++) |

遠心処理時間 : 10 分、共存培養期間 : 3~5 日、GUS 陽性未熟胚数/供試未熟胚数

()内は胚盤における GUS 発現領域の面積 -: なし, +: 小, ++: 中, +++: 大

表2 コシヒカリ未熟胚からのパロモマイシン耐性カルスの出現率（供試菌系：LBA4404/pSB133）

| 各選抜 培地 | 接種菌濃度 (cfu/ml) | 無処理 | 遠心加速度 | | |
|-----------|-------------------|------------|------------|-------------|-------------|
| | | | 760 G | 8,500 G | 19,100 G |
| N 培地 | 1×10^8 | 4.8%(1/21) | 0.0%(0/22) | 15.0%(3/20) | 31.8%(7/22) |
| | 1×10^9 | 4.3%(1/23) | 4.5%(1/22) | 16.7%(3/18) | 13.3%(2/15) |
| K 培地 | 1×10^8 | 0.0%(0/21) | 0.0%(0/22) | 14.3%(3/21) | 18.2%(4/22) |
| | 1×10^9 | 0.0%(0/23) | 0.0%(0/21) | 0.0%(0/19) | 0.0%(0/22) |

耐性カルスの出現した未熟胚数／供試未熟胚数、2次選抜終了時調査
遠心処理時間：10分、共存培養期間：3～5日

5 表3 月の光未熟胚からのパロモマイシン耐性カルスの出現率(供試菌系：LBA4404/pSB133)

| 各選抜 培地 | 接種菌濃度 (cfu/ml) | 無処理 | 遠心加速度 | | |
|-----------|-------------------|------------|------------|-------------|-------------|
| | | | 760 G | 8,500 G | 19,100 G |
| N 培地 | 1×10^8 | 0.0%(0/11) | 0.0%(0/11) | 30.0%(3/10) | 36.4%(4/11) |
| | 1×10^9 | 0.0%(0/11) | 9.1%(1/11) | 27.3%(3/11) | 54.5%(6/11) |
| K 培地 | 1×10^8 | 0.0%(0/10) | 0.0%(0/15) | 9.1%(1/11) | 9.1%(1/11) |
| | 1×10^9 | 0.0%(0/11) | 0.0%(0/11) | 0.0%(0/11) | 45.5%(5/11) |

耐性カルスの出現した未熟胚数／供試未熟胚数、2次選抜終了時調査
遠心処理時間：10分、共存培養期間：3～5日

表4 遠心処理時間と共存培養後のGUS発現結果（品種：コシヒカリ）

| 菌系及び プラスミド | 無処理 | 遠心処理時間 | | |
|-------------------|---------|-----------|-----------|------------|
| | | 10分 | 30分 | 60分 |
| LBA4404 (pSB133) | 9/10(+) | 9/10(++) | 10/10(++) | 10/10(+++) |
| LBA4404 (pTOK233) | 9/10(+) | 10/10(++) | 10/10(++) | 10/10(+++) |

10 遠心加速度：20,000G、供試品種：コシヒカリ GUS陽性未熟胚数／供試未熟胚数

胚盤領域におけるGUS発現領域の面積 +: 小, ++: 中, +++: 大

表5 遠心処理時間とパロモマイシン耐性カルスの出現率（品種：コシヒカリ）

| 各選抜 培地 | 培養条件 | 無処理 | 遠心処理時間 | | |
|-----------|--------------|------------|--------------|--------------|--------------|
| | | | 10分 | 30分 | 60分 |
| N 培地 | 明所(30 °C) | 0.0%(0/31) | 34.3%(12/35) | 35.0%(14/40) | 53.3%(16/30) |
| | 暗所(30 °C) | 0.0%(0/32) | 54.1%(20/37) | 34.2%(13/38) | 58.6%(17/29) |
| K 培地 | 明所(30 °C) | 0.0%(0/31) | 20.0%(7/35) | 38.5%(15/39) | 40.0%(12/30) |
| | 暗所(30 °C) | 0.0%(0/32) | 48.6%(17/35) | 41.0%(16/39) | 33.3%(10/30) |

遠心加速度：20,000G、共存培養期間：3～5日、2次選抜終了時調査

耐性カルスの出現した未熟胚数／供試未熟胚数

表6 遠心処理強度と共存培養後のGUS発現(品種：月の光)

| 各種遠心処理 | 共存培養 期間 | 未熟胚数 | | | |
|---------------------|------------|---------------|---|---|----|
| | | 胚盤におけるGUS発現頻度 | | | |
| | | — | ± | + | ++ |
| 無処理 | 3日間 | 6 | 4 | 0 | 0 |
| | 6日間 | 0 | 2 | 6 | 2 |
| 20KG ¹⁾ | 3日間 | 0 | 0 | 2 | 8 |
| | 6日間 | 0 | 0 | 2 | 8 |
| 40KG ²⁾ | 3日間 | 1 | 0 | 1 | 8 |
| | 6日間 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| 110KG ³⁾ | 3日間 | 1 | 0 | 5 | 4 |
| | 6日間 | 0 | 0 | 2 | 8 |
| 250KG ³⁾ | 3日間 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| | 6日間 | 10 | 0 | 0 | 0 |

5 供試菌系：LBA4404/pIG121Hm、遠心処理時間：60分

1) 微量高速遠心機 2) 大型高速遠心機 3) 超高速遠心機

胚盤部に占めるGUS発現領域の割合 -:なし, ±:<1/8, +:1/8-1/4, ++:>1/4

表7 遠心処理および共存培養期間と共に培養後のGUS発現(品種:月の光)

| 各種遠心処理 | 共存培養期間 | 未熟胚数 | | | |
|--------------------|--------|---------------|---|---|----|
| | | 胚盤におけるGUS発現頻度 | | | |
| | | - | ± | + | ++ |
| 無処理 | 3日間 | 5 | 4 | 1 | 0 |
| | 6日間 | 0 | 6 | 2 | 2 |
| | 13日間 | 0 | 5 | 2 | 3 |
| 20KG ¹⁾ | 3日間 | 0 | 2 | 5 | 3 |
| | 6日間 | 0 | 1 | 3 | 6 |
| | 13日間 | 0 | 1 | 3 | 6 |
| 40KG ²⁾ | 3日間 | 0 | 1 | 7 | 2 |
| | 6日間 | 0 | 0 | 8 | 2 |
| | 13日間 | 0 | 1 | 5 | 4 |

供試菌系: LBA4404/pIG121Hm、1)微量高速遠心機 2)大型高速遠心機

それぞれの回転数に対し、60分間の遠心処理

胚盤部に占めるGUS発現領域の割合 -:なし, ±:<1/8, +:1/8-1/4, ++:>1/4

5 表8 遠心処理および共存培養期間と共に培養後のGUS発現(品種:コシヒカリ)

| 各種遠心処理 | 共存培養期間 | 未熟胚数 | | | |
|--------------------|--------|---------------|---|---|----|
| | | 胚盤におけるGUS発現頻度 | | | |
| | | - | ± | + | ++ |
| 無処理 | 3日間 | 7 | 3 | 0 | 0 |
| | 6日間 | 3 | 1 | 0 | 0 |
| | 13日間 | 1 | 6 | 2 | 1 |
| 20KG ¹⁾ | 3日間 | 0 | 0 | 1 | 9 |
| | 6日間 | 0 | 0 | 2 | 8 |
| | 13日間 | 0 | 0 | 1 | 9 |
| 40KG ²⁾ | 3日間 | 1 | 0 | 4 | 5 |
| | 6日間 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| | 13日間 | 0 | 0 | 1 | 9 |

供試菌系: LBA4404/pIG121Hm、1)微量高速遠心機 2)大型高速遠心機

それぞれの回転数に対し、60分間の遠心処理

胚盤部に占めるGUS発現領域の割合 -:なし, ±:<1/8, +:1/8-1/4, ++:>1/4

表9 LBA4404(pBI121)による形質転換結果(品種:月の光)

| 各種処理 | 供試未熟胚数 | 順化数 | GUS陽性数 | 形質転換効率 |
|------|--------|-----|--------|---------|
| 無処理 | 50 | 17 | 12 | 24.0(%) |
| 遠心処理 | 150 | 60 | 54 | 36.0(%) |

遠心処理: 20KG・60分 共存培養 5日間

表 10 LBA4404(pIG121Hm)による形質転換結果（品種：月の光）

| 各種処理 | 供試未熟胚数 | 順化数 | GUS 陽性数 | 形質転換効率 |
|------|--------|-----|---------|---------|
| 無処理 | 40 | 9 | 3 | 7.5(%) |
| 遠心処理 | 47 | 10 | 5 | 10.6(%) |

遠心処理:20KG・60 分 共存培養 5 日間

表 11 LBA4404(pBI121)による形質転換結果（品種：コシヒカリ）

| 各種処理 | 供試未熟胚 数 | 順化数 | GUS 陽性数 | 形質転換効率 |
|------|------------|-----|---------|--------|
| 無処理 | 49 | 4 | 2 | 4.1(%) |
| 遠心処理 | 274 | 35 | 27 | 9.9(%) |

遠心処理:20KG・60 分 共存培養 5 日間

5 表 12 LBA4404(pSB133)による形質転換結果（品種：コシヒカリ）

| 各種処理 | 供試未熟胚 数 | 順化数 | GUS 陽性数 | 形質転換効率 |
|------|------------|-----|---------|--------|
| 無処理 | 63 | 0 | — | 0.0(%) |
| 遠心処理 | 281 | 30 | 23 | 8.2(%) |

遠心処理:20KG・60 分 共存培養 3 日間

実施例 2

大きさ約 1.2 mm のトウモロコシ未熟胚（品種 A188、農林水産省生物資源研究所より入手）を無菌的に取り出し、LS-inf 液体培地で一回洗浄した。遠心管に未熟胚と $100 \mu M$ のアセトシリンゴンを含む LS-inf 培地 2.0 ml に約 1×10^9 cfu/ml の濃度で、*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404(pSB131) (Ishida et al. 1996(参考文献(18))) を懸濁した液を加え、40,000G, 4°Cで 30 分間遠心処理した。対照の未熟胚は、前記と同様の細菌懸濁液中で 30 分間、室温で静置した。処理後、緩やかに攪拌した後、胚軸面が培地に接するように LS-AS 培地に置床した。また、遠心処理後の未熟胚への接種は、以下の通り行った。無菌的に取り出した未熟胚を LS-inf 液体培地で一回洗浄した後、同液体培地を含む遠心管に移し、20 KG または 40 KG で 4°C、1 時間の遠心処理を行った。対照は液体培地中で 1 時間、室温で静置した。処理後、液体培地を除き、約 1×10^9 cfu/ml の濃度で LBA4404(pSB131) を懸濁した液を加え、緩やかに攪拌した。5 分間室温で静置した後、胚軸面が培地に接するように 10 μM AgNO₃ を含む LS-AS 培地に置床した。25°C、暗黒下で 3 日間共存培養した後、一部の未熟胚を採取し、実施例 1 20

と同様に X-gluc により GUS 遺伝子のトランジェントな発現を調査した。なお、上記の培地および培養法は、Ishida, Y. et al. 1996(参考文献(18))に記載の方法に従った。

LBA4404(pSB131) を接種した A188 未熟胚での GUS 遺伝子のトランジェントな発現を表 13 に示す。いずれの未熟胚も GUS 遺伝子の発現を示したが、対照の未熟胚に比べ、遠心処理を行った未熟胚では、より広い範囲での発現を示すものが多く確認された。遠心処理による遺伝子導入部位の増大は、アグロバクテリウム菌とともに遠心処理を行った場合、遠心処理後アグロバクテリウム菌を接種した場合の両方で認められた。また、遠心強度及び処理時間を変えた場合でも対照に比べより広い範囲での GUS 遺伝子の発現が認められた。

以上の結果から、遠心処理した未熟胚を選抜培地で培養すれば、対照に比べより高い効率で、形質転換植物の得られる可能性が示された。また、従来のアグロバクテリウム法では形質転換できなかった A188 以外のトウモロコシ品種 (Ishida et al. 1996(参考文献(18))) についても遠心処理することにより形質転換植物の得られる可能性が示唆された。

表 13 A188 未熟胚での GUS 遺伝子のトランジェントな発現

| 試験 | 処理 | | 供試 未熟胚数 | GUS 遺伝子の発現 | | | |
|----|----|-----|------------|------------|----|----|---|
| | KG | min | | +++ | ++ | + | - |
| 1 | 40 | 30 | 27 | 7 | 10 | 10 | 0 |
| | 対照 | 30 | 30 | 1 | 17 | 12 | 0 |
| 2 | 40 | 60 | 20 | 0 | 3 | 17 | 0 |
| | 20 | 60 | 20 | 0 | 10 | 10 | 0 |
| | 対照 | 60 | 20 | 0 | 1 | 19 | 0 |

対照は 1 G での処理。

試験 1 はアグロバクテリウム菌共存下で遠心処理を行った。試験 2 は遠心処理後、アグロバクテリウム菌の接種を行った。

参考文献

- (1) Aldemita RR, Hodges TK (1996) Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of japonica and indica rice varieties. *Planta* 199: 612-617
- (2) An, G., Evert, P.R., Mitra, A. and Ha, S.B. (1988) Binary vectors. In G. Ivin, S.B. and Schilperoort, R.A. (eds.), *Plant Molecular Biology Ma*

nual A3. Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp. 1-19.

(3) An, G., Watson, BD., Stachel, S., Gordon, MP. & Nester, EW., (1985) New cloning vehicles for transformation of higher plants. EMBO J., 4:277-288.

5 (4) Bevan, M. (1984) Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. Nucleic Acids Res., 12, 8711-8721.

(5) Bidney, D., Scelorange, C., Martich, J., Burrus, M., Sims, L., and Hufmann G. (1992) Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by Agrobacterium tumefaciens. Plant Mol. Biol.,

10 18, 301-313.

(6) Chilton, M-D., Currier, TC. Farrand, SK. Bendich, AJ. Gordon, MP. & Nester EW. (1974) Agrobacterium tumefaciens DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71:3672-3676

15 (7) Chu, C. C., (1978) Proc. Symp. Plant Tissue Culture, Science Press Peking, pp. 43-50

(8) Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. and Helinski, D.R. (1980) Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of gene bank of Rhizobium meliloti. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 7347-7351.

(9) Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Eicholtz, D.A. and Flick, J.S. (1985) The SEV system: a new disarmed Ti plasmid vector for plant transformation. Bio/technology, 3, 629-635.

25 (10) Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M.L., Brand, L.A., Fink, G.L., Fry, J.S., Galluppi, G.R., Goldberg, S.B., Hoffmann, N.L. and Woo, S.C. (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. Proc Natl Acad Sci USA, 80, 4803-4807.

(11) Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. and Kumashiro, T. (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa L.*) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal*, 6, 271–282.

5 (12) Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J. and Schilperoort, R.A. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, 303, 179–180.

(13) Hood, E.E., Fraley, R.T. and Chilton, M.-D. (1987) Virulence of *Agrobacterium tumefaciens* strain A281 on legumes. *Plant Physiol*, 83, 529–534.

10 (14) Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S. and Hoekema, A. (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res.*, 2, 208–218.

(15) Hood, E.E., Helmer, G.L., Fraley, R.T. and Chilton, M.-D. (1986) The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J. Bacteriol.*, 168, 1291–1301.

15 (16) Hood, E.E., Jen, G., Kayes, L., Kramer, J., Fraley, R.T. and Chilton, M.-D. (1984) Restriction endonuclease map of pTiBo542, a potential Ti-plasmid vector for genetic engineering of plants. *Bio/technology*, 2, 702–709.

20 (17) Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rpgers, S.G. and Fraley, R.T. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227, 1229–1231.

(18) Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T. and Kumashiro, T. (1996) High efficiency transformation of maize (*Zea mays L.*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnol*, 14, 745–750.

25 (19) Jefferson, R.A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 5, 387–405.

(20) Jin, S., Komari, T., Gordon, M.P. and Nester, E.W. (1987) Genes responsible for the supervirulence phenotype of *Agrobacterium tumefaciens* A 281. *J. Bacteriol.*, 169, 4417-4425.

5 (21) Komari, T. (1989) Transformation of callus cultures of nine plant species mediated by *Agrobacterium*. *Plant Sci.*, 60, 223-229.

(22) Komari, T. (1990a) Genetic characterization of double-flowered tobacco plant obtained in a transformation experiment. *Theor. Appl. Genet.*, 80, 167-171.

10 (23) Komari, T. (1990b) Transformation of cultured cells of *Chenopodium quinoa* by binary vectors that carry a fragment of DNA from the virulence region of pTiBo542. *Plant Cell Reports*, 9, 303-306.

(24) Komari, T., Halperin, W. and Nester, E.W. (1986) Physical and functional map of supervirulent *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing plasmid pTiBo542. *J. Bacteriol.*, 166, 88-94.

15 (25) Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N. and Kumashiro, T. (1996) Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J.*, 10, 165-174.

(26) Komari, T. and Kubo, T. (1999) Methods of Genetic Transformation: A 20 *Agrobacterium tumefaciens*. In Vasil, I.K. (ed.) *Molecular improvement of cereal crops*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 43-82.

(27) Li, H.-Q., Sautter, C., Potrykus, I. and Puonti-Kaerlas, J. (1996) Genetic transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Nature Biotechnol.*, 14, 736-740.

25 (28) Lindsey, K., Gallois, P. and Eady, C. (1991) Regeneration and transformation of sugarbeet by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Tissue Culture Manual B7:1-13*. Kluwer Academic Publishers.

(29) McCormick, S. (1991) Transformation of tomato with *Agrobacterium tu*

mefaciens. Plant Tissue Culture Manual B6:1-9. Kluw r Academic Publisher s.

(30) Murashige, T. and Skoog, F. (1962) Physiol. Plant 15:473-497.

5 (31) Ohira, K., Ojima, K., Fujiwara, A. (1973) Studies on the nutrition of rice cell culture I. A simple, defined medium for rapid growth in sus-
pension culture. Plant Cell Physiol., 14:1113-1121.

(32) Ohta, S., Mita, S., Hattori, T., Namamura, K. (1990) Construction and expression in tobacco of a β -glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. Plant Cell Physiol. 31: 805-

10 813.

(33) Potrykus, I., Bilang, R., Futterer, J., Sautter, C. and Schrott, M. (1998) Agricultural Biotechnology, NY:Mercel Dekker Inc. pp. 119-159.

15 (34) Rogers, S.G., Horsch, R.B. and Fraley, R. T. (1988) Gene transfer i n plants: Production of transformed plants using Ti plasmid vectors. Met hod for Plant Molecular Biology, CA: Academic Press Inc. pp. 423-436.

(35) Saito, Y., Komari, T., Masuta, C., Hayashi, Y., Kumashiro, T. and T akanami, Y. (1992) Cucumber mosaic virus-tolerant transgenic tomato plan ts expressing a satellite RNA. Theor. Appl. Genet., 83, 679-683.

(36) Toriyama, K. and Hinata, K. (1985) Plant Sci. 41:179-183

20 (37) Trick, H.N. and Finer, J.J. (1997) SAAT: sonication-assisted Agroba cterium-mediated transformation. Transgenic Research 6:329-336.

(38) Visser, R. G. F. (1991) Regeneration and transformation of potato by Agrobacterium tumefaciens. Plant Tissue Culture Manual B5:1-9. Kluwer Academic Publishers.

25 (39) Watson, B., Currier, T.C., Gordon, M.P., Chilton, M.-D. and Nester, E.W. (1975) Plasmid required for virulence of Agrobacterium tumefaciens. J Bacteriol, 123, 255-264.

(40) Zambryski, P., Joos, H., Genet 110, C., Leemans, J., Van Montagu, M.

24

and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. EMBO J, 2, 2143-2150.

請求の範囲

1. 植物細胞又は植物組織を遠心処理することを伴う、アグロバクテリウム属細菌を介して行われる植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法。
2. 植物細胞又は植物組織を遠心処理した後、遺伝子導入処理を行う請求項1記載の方法。
5 3. 遠心処理が100G～25万Gの遠心加速度の範囲で行われる請求項1又は2記載の方法。
4. 遠心処理が500G～20万Gの遠心加速度の範囲で行われる請求項3記載の方法。
10 5. 遠心処理が1000G～15万Gの遠心加速度の範囲で行われる請求項4記載の方法。
6. 遠心処理が1秒間～4時間の範囲で行われる請求項1ないし5のいずれか1項に記載の方法。
15 7. 遠心処理が5分間～2時間の範囲で行われる請求項6記載の方法。
8. 請求項1ないし7記載の方法を用いることを特徴とする植物の作出方法。
9. 請求項1ないし8記載の方法により作出される植物細胞、植物組織又は植物。
10. 用いる植物細胞又は植物組織が被子植物由来である請求項1ないし7のいずれか1項に記載の方法。
20 11. 請求項9記載の方法を用いることを特徴とする被子植物の作出方法。
12. 請求項10または11記載の方法により作出される被子植物細胞、被子植物組織又は被子植物。
13. 用いる植物細胞又は植物組織が単子葉植物由来である請求項10記載の方法。
25 14. 請求項11記載の方法を用いることを特徴とする単子葉植物の作出方法。
15. 請求項13または14記載の方法により作出される単子葉植物細胞、単子葉植物組織又は単子葉植物。
16. 用いる植物細胞又は植物組織がイネ科植物由来である請求項13記載の

方法。

17. 請求項13記載の方法を用いることを特徴とするイネ科植物の作出方法

18. 請求項16または17記載の方法により作出されるイネ科植物細胞、イネ科植物組織又はイネ科植物。

5 19. 用いる植物細胞又は植物組織がイネ又はトウモロコシである請求項16記載の方法。

20. 請求項19記載の方法を用いることを特徴とするイネ又はトウモロコシの作出方法。

10 21. 請求項19または20記載の方法により作出されるイネ細胞、イネ組織、イネ、トウモロコシ細胞、トウモロコシ組織又はトウモロコシ。

1/4

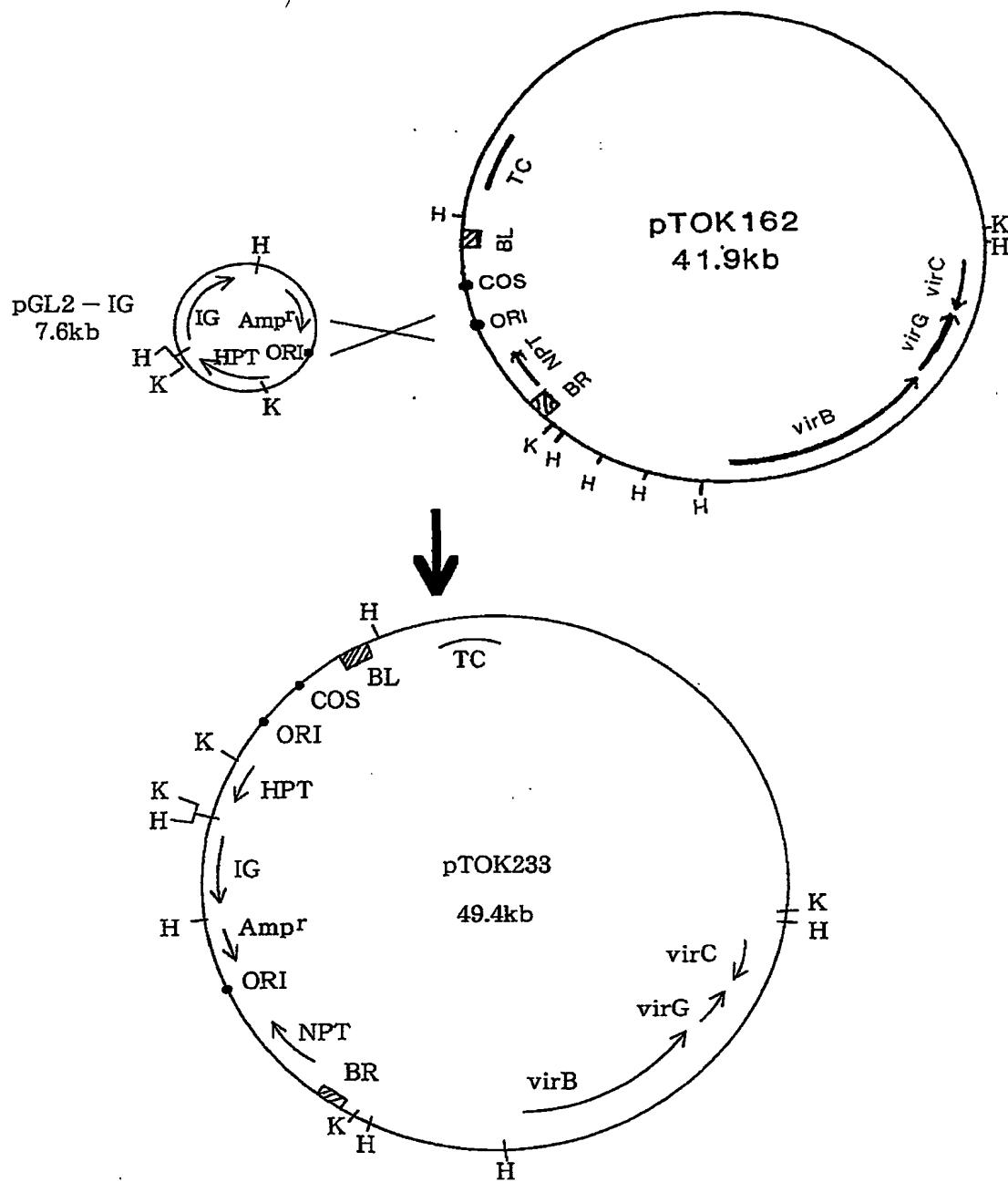


図 1



2/4

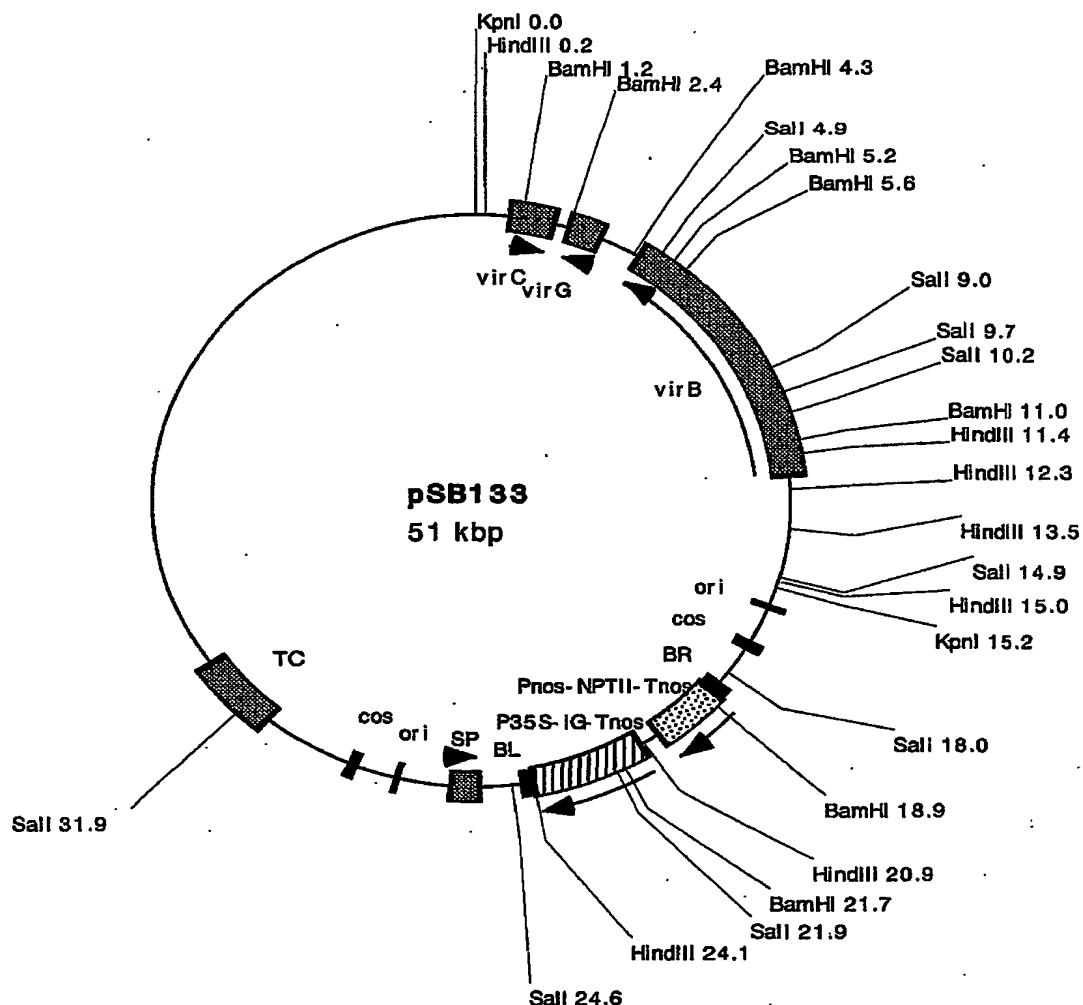
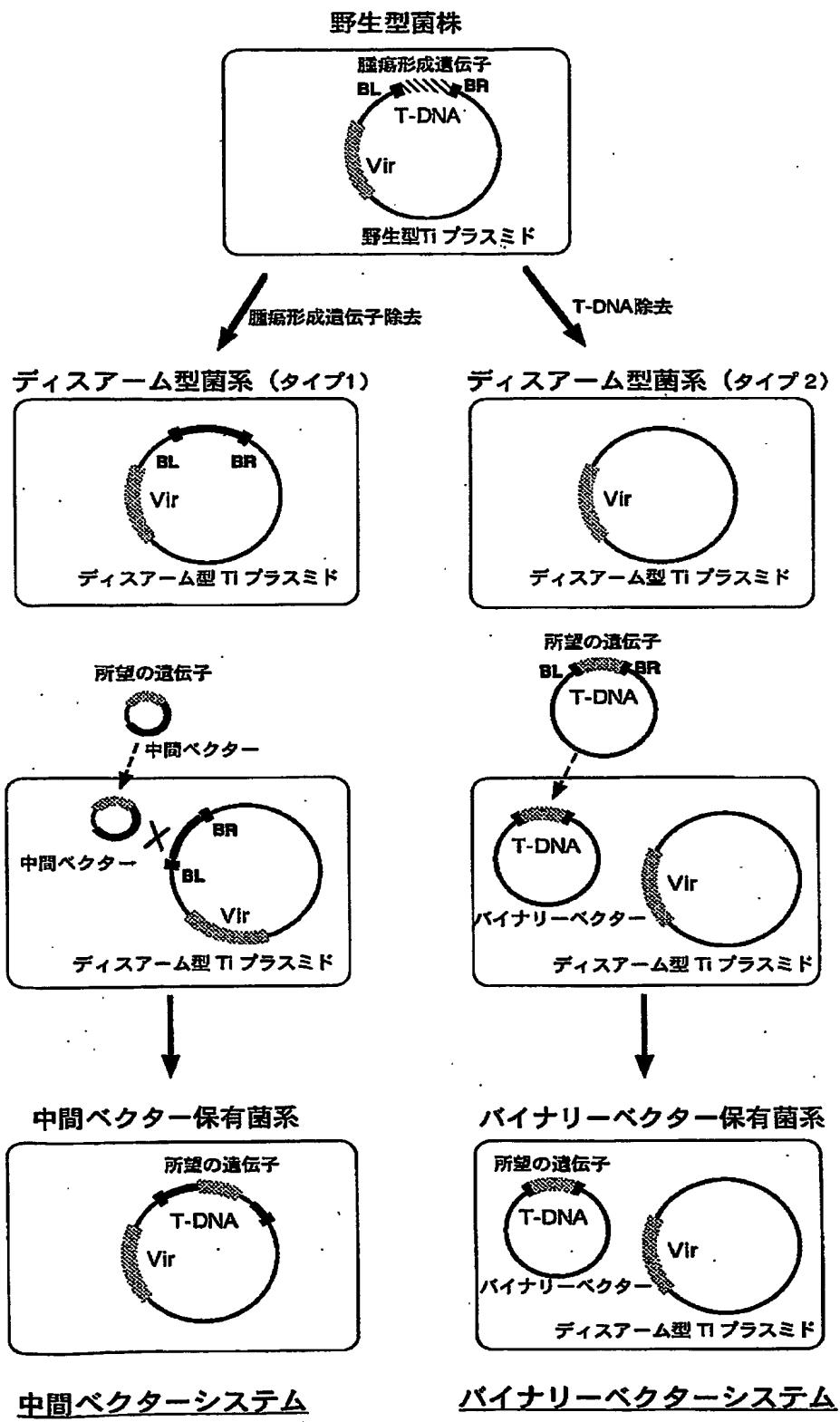


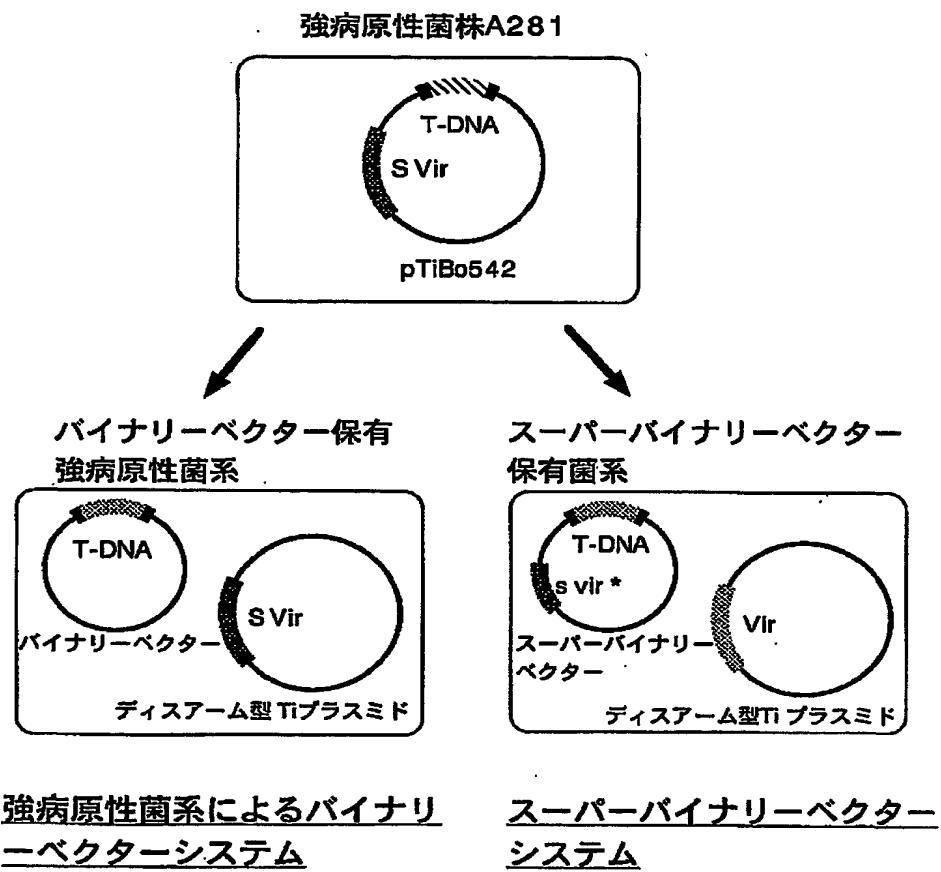
図 2

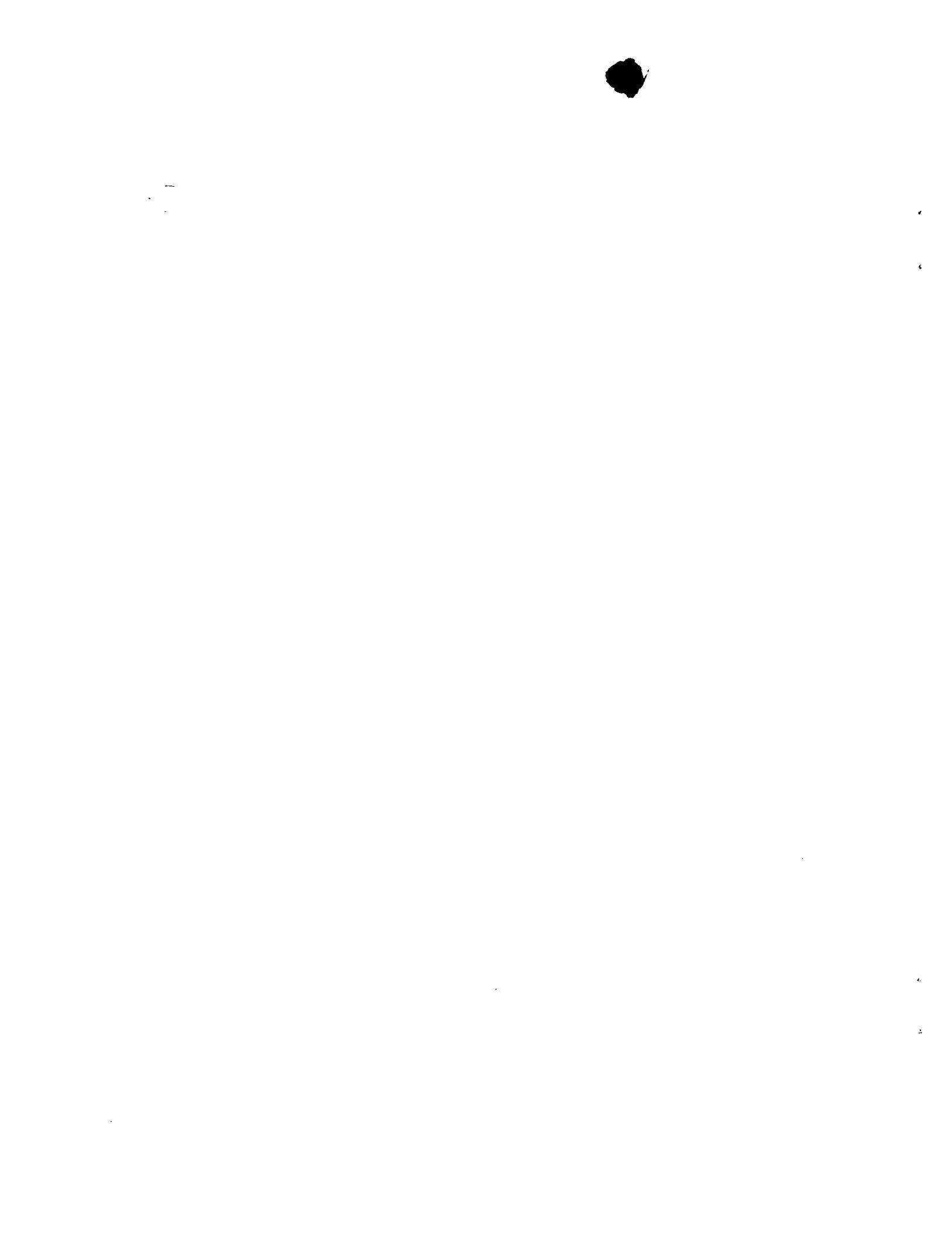


3/4

**図 3**



**図 4**



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05213

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 15/84, 5/14, A01H 1/00, 5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 15/00-15/90, A01H 1/00-15/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI/L(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), MEDLINE, JICST FILE(JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim N . |
|-----------|--|-----------------------|
| A | JP 10-179174 A (Hokko Chemical Industry Co., Ltd.), 07 July, 1998 (07.07.98) (Family: none) | 1-21 |
| A | WO 00/37663 A2 (THE SAMUEL ROBERTS NOBLE FOUNDATION, INC.), 29 June, 2000 (29.06.00) & AU 200025943 A | 1-21 |
| A | TRICK, H. N. et al., "SAAT: sonication-assisted Agrobacterium-mediated transformation", Transgenic Research, (September, 1997), Vol.6, No.5, pages 329-336 | 1-21 |
| A | HORSCH, R.B. et al., "A Simple and General Method for Transferring Genes into Plants", Science, (08 August, 1997), Vol.227, No.4691, pages 1229-1231 | 1-21 |

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17 October, 2000 (17.10.00)Date of mailing of the international search report
31 October, 2000 (31.10.00)Name and mailing address f the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized fficer

Facsimile No.

Telephone No.



A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C12N 15/84, 5/14, A01H 1/00, 5/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C12N 15/00-15/90, A01H 1/00-15/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI/L(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), MEDLINE, JICSTファイル(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| A | JP, 10-179174, A(北興化学工業株式会社) 7.7月. 1998(07. 07. 98) (ファミリーなし) | 1-21 |
| A | WO, 00/37663, A2(THE SAMUEL ROBERTS NOBLE FOUNDATION, INC.) 29.6月. 2000(29. 06. 00) & AU, 200025943, A | 1-21 |

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 10. 00

国際調査報告の発送日

31.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

内田 俊生

(印)

(印)

4 N 2937

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

| C (続き) 関連すると認められる文献 | | |
|---------------------|---|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| A | TRICK, H. N. et al. "SAAT: sonication-assisted <i>Agrobacterium</i> -mediated transformation.", Transgenic Research (Sept., 1997) Vol. 6, No. 5, p. 329-336 | 1-21 |
| A | HORSCH, R. B. et al. "A Simple and General Method for Transferring Genes into Plants.", Science (Mar. 8, 1985) Vol. 227, No. 4691, p. 1229-1231 | 1-21 |

E P

U S

P C T

特 許 協 力 条 約

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

| | | |
|----------------------------------|---|----------------|
| 出願人又は代理人 の書類記号 00PF208-PCT | 今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。 | |
| 国際出願番号 PCT/JP00/05213 | 国際出願日 (日.月.年) 03.08.00 | 優先日 (日.月.年) |
| 出願人(氏名又は名称) 日本たばこ産業株式会社 | | |

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
 この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
 この国際出願に含まれる書面による配列表
 この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. 発明の單一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は 出願人が出したものを承認する。

次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は 出願人が出したものを承認する。

第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1ヶ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
第_____図とする。 出願人が示したとおりである。

なし

出願人は図を示さなかった。

本図は発明の特徴を一層よく表している。



A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.C1' C12N 15/84, 5/14, A01H 1/00, 5/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.C1' C12N 15/00-15/90, A01H 1/00-15/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI/L(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), MEDLINE, JICSTファイル(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| A | JP, 10-179174, A(北興化学工業株式会社) 7. 7月. 1998(07. 07. 98) (ファミリーなし) | 1-21 |
| A | WO, 00/37663, A2(THE SAMUEL ROBERTS NOBLE FOUNDATION, INC.) 29. 6月. 2000(29. 06. 00) & AU, 200025943, A | 1-21 |

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 10. 00

国際調査報告の発送日

31.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

内田 俊生

4 N 2937



電話番号 03-3581-1101 内線 3488

| C(続き) 関連すると認められる文献 | | 関連する請求の範囲の番号 |
|--------------------|--|--------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | |
| A | TRICK, H. N. et al. "SAAT: sonication-assisted <i>Agrobacterium</i> -mediated transformation.", Transgenic Research(Sept., 1997) Vol. 6, No. 5, p. 329-336 | 1-21 |
| A | HORSCH, R. B. et al. "A Simple and General Method for Transferring Genes into Plants.", Science(Mar. 8, 1985) Vol. 227, No. 4691, p. 1229-1231 | 1-21 |

PATENT COOPERATION TREATY

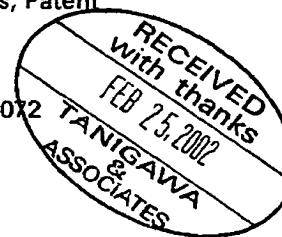
PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES
(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TANIGAWA, Hidejiro
Tanigawa and Associates, Patent
Firm
6F, Iwata Bldg.
5-12, Iidabashi 4-chome
Chiyoda-ku, Tokyo 102-0072
JAPON



| |
|---|
| Date of mailing (day/month/year) 14 February 2002 (14.02.02) |
|---|

| |
|--|
| Applicant's or agent's file reference 00PF208-PCT |
|--|

IMPORTANT NOTICE

| | | |
|---|---|--------------------------------|
| International application No. PCT/JP00/05213 | International filing date (day/month/year) 03 August 2000 (03.08.00) | Priority date (day/month/year) |
|---|---|--------------------------------|

| |
|---------------------------------------|
| Applicant JAPAN TOBACCO INC. et al |
|---------------------------------------|

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this notice:
KP,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
AE,AG,AL,AM,AP,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EA,EE,EP,
ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,
MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OA,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on
14 February 2002 (14.02.02) under No. WO 02/12520

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/I/B/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and the PCT Applicant's Guide, Volume II.

| | |
|--|---|
| The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland facsimile No. (41-22) 740.14.35 | Authorized officer J. Zahra Telephone No. (41-22) 338.91.11 |
|--|---|

